

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-118291

(43)Date of publication of application : 09.05.1995

(51)Int.Cl. C07K 1/113  
C07K 16/00  
G01N 33/53

(21)Application number : 05-285700

(71)Applicant : NISSUI PHARM CO LTD

(22)Date of filing : 21.10.1993

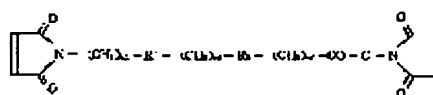
(72)Inventor : OKU YUICHI

(54) COMPLEX OF NUCLEIC ACID AND IMMUNOCHEMICALLY ACTIVE MATERIAL, ITS PRODUCTION AND IMMUNOCHEMICAL MEASURING REAGENT USING THEREOF

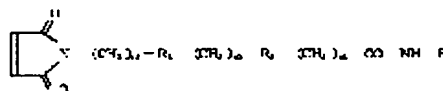
(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain, in a high yield, the complex having high activities, useful for immunochemical measurement by reacting a specific compound containing a maleimide group with a nucleic acid and further with an immunochemically active compound.

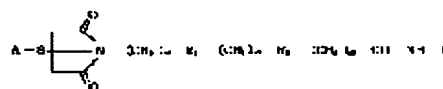
CONSTITUTION: A nucleic acid is reacted with a compound of the formula I (R1 and R2 are each single bond or 6 membered ring hydrocarbon residue; n1, n2 and n3 are each 0-15) to obtain a compound of the formula II (B is a residue when a nucleic acid is expressed by B-NH2) which is, then, reacted with an immunoactive material to obtain the complex of the formula III (A is a residue when an immunochemically active material is expressed by A-SH).



I



II



III

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.03.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(11)特許出願公開番号

(43)公開日 平成7年(1995)5月9日

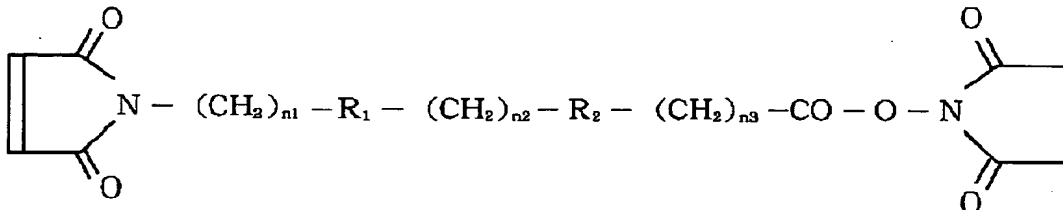
M

それぞれ化学結合または6員環状炭化水素残基を表す。]

【特許請求の範囲】

【化 1】

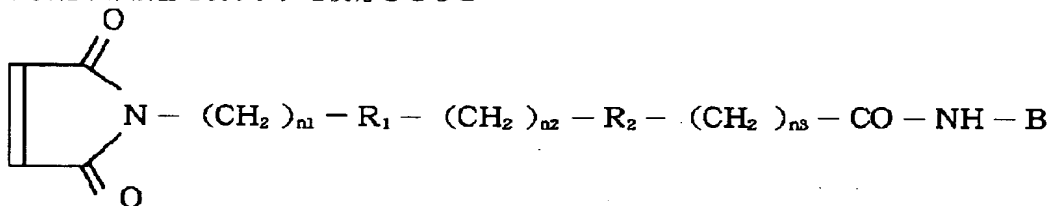
【請求項 1】 核酸に次の一般式で表される化合物



〔式中、 $n_1, n_2, n_3$  および  $n_4$  はそれぞれ独立した 0 から 15 のあいだの整数を、 $R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ化学結合 または 6 員環状炭化水素残基を表す。〕を反応させるこ

とにより、次の一般式で示される化合物

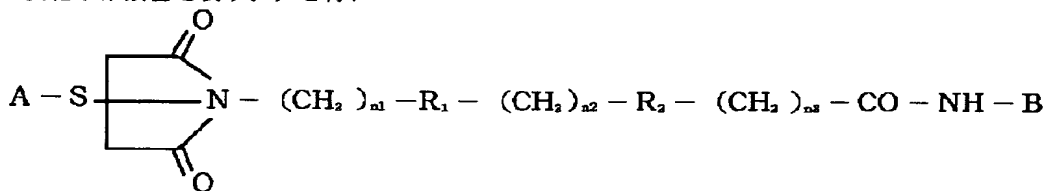
10 【化 2】



〔式中、 $B$  は核酸を  $B-NH_2$  で表したときのその残基を表し、 $n_1, n_2, n_3$  および  $n_4$  はそれぞれ独立した 0 から 15 のあいだの整数を、 $R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ化学結合 または 6 員環状炭化水素残基を表す。〕を得、

次いでこの化合物を免疫化学的活性物質と反応させることにより、次の一般式で表される化合物

20 【化 3】



〔式中、 $A$  は免疫化学的活性物質を  $A-SH$  で表したときのその残基を表し、 $B, n_1, n_2, n_3, n_4, R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ化学結合または 6 員環状炭化水素残基を表す。〕を得ることを特徴とする核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

【請求項 2】 前記核酸が、ポリリボヌクレオチド、ポリデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチドあるいはこれら 2 種以上の複合体から選ばれたものである請求項 1 記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

【請求項 3】 前記免疫化学的活性物質が抗体である請求項 1 または 2 記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

【請求項 4】 前記免疫化学的活性物質が抗原である請求項 1、2 または 3 記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

【請求項 5】 前記抗体が IgG またはその消化物であ

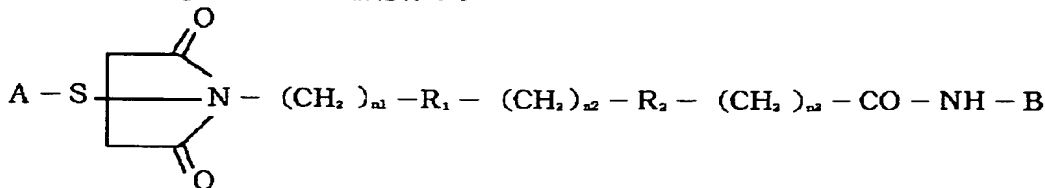
る請求項 4 記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

30 【請求項 6】 前記 IgG の消化物が Fab' である請求項 5 記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

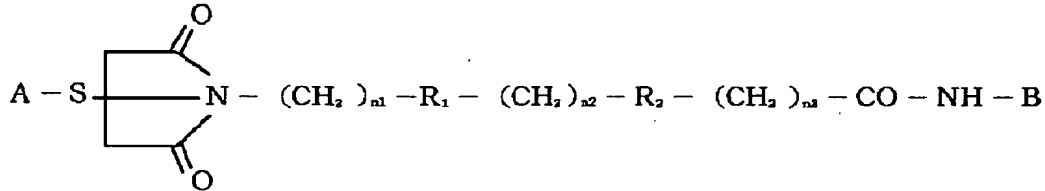
【請求項 7】 前記核酸に含有されるアミノ基 ( $NH_2$ 、 $-$ ) が、核酸の 3' 末端または 5' 末端のもの、あるいは核酸の分子中に導入されたものである請求項 1、2、3、4、5 または 6 記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法。

【請求項 8】 請求項 1、2、3、4、5、6 または 7 記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法により得られ、次の一般式で表される免疫化学的分析に使用されることを特徴とする核酸と免疫化学的活性物質との複合体。

【化 4】



【請求項 9】 請求項 1、2、3、4、5、6 または 7 記載の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法により得られ、次の一般式で表される核酸と免疫化学的



# 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、抗原抗体反応を利用した免疫化学的分析に使用することができる核酸と免疫化学的活性物質との複合体自体、その製造方法及び核酸と免疫化学的活性物質との複合体自体を使用する免疫化学的測定試薬に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 臨床検査の分野において免疫化学的検出法は、微量の成分を定量、検出する方法として知られ、種々の方法が開発されている。その中で抗体の標識物質として、蛍光物質、発光性物質、酵素等の非放射性物質を使用する免疫化学的検出法は、標識物質として放射性物質を使用した際のように特殊な施設を必要とせず、試薬の扱いやすさ、大量処理が可能などの点から生体成分分析法で広く利用されている。また、標識物質として放射性同位元素を用いるラジオイムノアッセイもその測定レンジの広さ、免疫反応の低下が少なく、薬剤、ペプチドなどの小さな分子量の物質を標識可能であることから広く利用されている。

【0003】 このような免疫化学的検出法において、標識された抗体が直接固相に結合して非特異反応を起こす、いわゆる測定のバックグラウンドの上昇が近年問題となっており、このような非特異反応を防ぐことにより、測定感度を上げようとする試みが、例えば、特開平 4-204379 号公報によりなされている。

【0004】 (1) 特開平 4-204379 号公報に開示の免疫化学的検出方法

図 1 は該公報に開示された免疫化学的検出法のプロセスを示す図であり、この図 1 に基づいて、該公報に記載の技術を次に説明する。1 は固相であり、2 は固相 1 に結合した核酸である。一方、核酸 2 と相補的な塩基配列を有する核酸 3 の末端には免疫化学的活性物質である抗体 4 が結合されており、前記核酸 2 と核酸 3 は相補的に結合することにより、抗体 4 を固相 1 に固定している。

【0005】 この固相 1 に対して測定対象物である抗原 5 を含む試料を接触させ (図 1 (a))、抗原抗体反応により試料中に含まれている抗原 5 を固相 1 上に結合している抗体 4 で捕捉し (図 1 (b))、さらに捕捉された抗原 5 に対して、標識物 7 で標識された抗体 6 を結合させる。もしこの段階で標識物 7 を定量することにより

活性物質との複合体を含んだことを特徴とする免疫化学的測定試薬。

## 【化 5】

10 試料中の抗原 5 を測定する場合、標識物 7 で標識された別の抗体が固相 1 に結合してバックグラウンドを上昇させるので正確な測定が困難となる。したがって、制限酵素 8 を核酸部分に作用させることにより (図 1

(c))、核酸を選択的に切断して (図 1 (d))、固相 1 から分離された標識物 7 を含んだものを定量することにより、試料中に含まれる抗原 5 をバックグラウンドの影響が無く精度よく定量することができる。

【0006】 前記公報によれば、核酸 3 とその末端に結合される抗体 4 との結合方法は、例えば、ゴッシュラの方法 (Ghosh et al: Bioconjugate Chem., 1, 71~76 頁 (1990)) のマレイミド-チオールカップリングにより結合したとされている。前記公報に引用された文献のゴッシュラの方法には、次の 2 つの結合方法が示されている。図 2 及び図 3 に基づいて、ゴッシュラの方法を説明する。

## 【0007】 (2) ゴッシュラの方法

i. その一つは、図 2 に示される方法であり、核酸の 5' 末端にスルフヒドリル基を導入しておき、他方、酵素に 6-マレイミドヘキサノイックアシッドスクシニドエステルを反応させてマレイミド基を導入しておき、次に、これらの 2 種の化合物を反応させて前記のスルフヒドリル基とマレイミド基を結合させることにより、核酸と酵素とを結合させる方法である。

【0008】 この方法によれば、添加したアルカリ性フォスファターゼの 85% がオリゴヌクレオチドに結合したアルカリ性フォスファターゼ、即ち、核酸-酵素複合体として回収されること、及びオリゴヌクレオチドとアルカリ性フォスファターゼの結合比は 1 対 1 であり、この核酸-酵素複合体は何の処理も施していない酵素の 80 から 85% の活性が保持されていたことが示されている。また、β-ガラクトシダーゼに関しては、その核酸-酵素複合体として回収率は 65%、この核酸-酵素複合体は何の処理も施していない酵素の 75% の酵素活性が保持されていたことが示されている。

【0009】 ii. ゴッシュラのもう一つの方法は、図 3 に示される方法であり、核酸の 5' 末端に前記の方法と同じようにスルフヒドリル基を導入し、このスルフヒドリル基にさらにホモ二官能性試薬である N, N' - 1, 2-フェニレンジマレイミドを反応させることにより、核酸の 5' 末端にマレイミド基を導入しておき、他

方、酵素にスルフヒドリル基を導入しておき、得られたこれらの2種の化合物を反応させることにより、核酸と酵素とを結合させる方法である。この方法によれば、ペルオキシダーゼに関しては、その核酸-酵素複合体としての回収率は58%であり、この核酸-酵素複合体の何の処理も施していない酵素に対する酵素活性の回収率は70~75%であることが示されている。

【0010】この他に、核酸を一般的なタンパク質に導入する方法は、例えば、Nucleic Acids Research 第15巻5275頁(1987年)およびNucleic Acids Research 第16巻3671頁(1988年)に記載された方法が知られており、これらの技術を簡単に次に説明する。

【0011】(3) Nucleic Acids Research 第15巻5275頁(1987年)に記載の方法

オリゴヌクレオチドの3'末端にアミノ基を導入しておきホモ二官能性試薬であるジチオ-ビス-プロピオニクアシッド-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

(略称:ジチオ-ビス-プロピオニル-NHS)を反応させる。反応後、ジチオトレイトールを添加することによりジチオ-ビス-プロピオニル-NHS分子中のジスルフィド結合を還元して、オリゴヌクレオチドの3'末端にスルフヒドリル基を導入する。

【0012】一方、一般的なタンパク質であるアルカリ性フォスファターゼとプロモアセチルアシッド-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(略称:プロモアセチル-NHS)を反応させることによって、アルカリ性フォスファターゼの遊離アミノ基にプロモアセチル基を導入する。この後にスルフヒドリル基導入オリゴヌクレオチドとプロモアセチル基導入アルカリ性フォスファターゼを混合して、スルフヒドリル基とプロモアセチル基を反応させて結合させることにより、オリゴヌクレオチドとアルカリ性フォスファターゼを結合させる。この方法では60から80%の酵素が酵素-オリゴヌクレオチド複合体として回収される。

【0013】この文献には、このようにして得られた酵素-オリゴヌクレオチド複合体は、腸管毒素原性大腸菌に特異的な遺伝子配列をDNA-DNAハイブリダイゼーションにより検出する方法に用いられることが述べられているだけで、免疫化学的分析法については示唆はない。

【0014】(4) Nucleic Acids Research 第16巻3671頁(1988年)に記載の方法

この方法を簡単に説明する。オリゴヌクレオチドを、シスタミン、カルボジイミド及び1-メチルイミダゾールと反応させることによって、オリゴヌクレオチドの5'末端の水酸基にスルフヒドリル基を導入する。得られるスルフヒドリル基導入オリゴヌクレオチドを精製した後、ジチオトレイトールを用いて還元し、この後に2,2'-ジビリルジスルフィドを加えることによってオリ

リゴヌクレオチドの5'末端にジスルフィド結合を介してビリル基を導入する。

【0015】一方、一般的なタンパク質としてのブラジキニン、ペルオキシダーゼ、IgGに対してイミノチアレンを反応させてスルフヒドリル基を導入しておく。これらビリルジスルフィド基導入オリゴヌクレオチドとスルフヒドリル基導入タンパク質を混合して、ビリル基とスルフヒドリル基の特異的な反応により、タンパク質とオリゴヌクレオチドを結合させる。この報告では、IgGを用いたオリゴヌクレオチド-タンパク質複合体の回収率が30~50%であったことが述べられている。

【0016】また、この文献においてはそのオリゴヌクレオチド-IgG複合体のIgGに対する抗体を用いた反応性が確かめられている。すなわち、ヤギ抗IgGを固相上に固定しておき、オリゴヌクレオチド-IgG複合体の核酸を<sup>32</sup>Pで標識することによって、オリゴヌクレオチド-IgG複合体の固相への反応性が報告されているだけであり、このようなオリゴヌクレオチド-IgG複合体の免疫化学的分析法への適用可能性については何も記載はない。

【0017】また、特開平5-48100号公報にはタンパク質と核酸の結合体とするためのタンパク質自体を試薬としたものが知られているので、次に、この方法を説明する。

【0018】(5) 特開平5-84100号公報に記載の方法

該公報に記載の発明は、タンパク質中の官能基(例えば、アミノ基)と反応しうる第1の反応性基(スクシンイミド基)、およびスルフヒドリル基(別名、チオール基)と反応しうる第2の反応性基(例えば、マレイミド基等)を有するヘテロ二官能性架橋剤と、蛋白質を反応させることにより、タンパク質に第2の反応性基を導入して予め活性化されたタンパク試薬としており、このようにして得られたタンパク試薬を、チオール化ポリヌクレオチドのスルフヒドリル基、またはチオール含有タンパク質のスルフヒドリル基へ共有結合させるためのキットとすることが開示されている。

【0019】しかしながら、このタンパク試薬を使用して得られるタンパク質と核酸の結合体を免疫化学的分析法に利用することについては何も示唆はない。

【0020】以上のように、核酸と、酵素または抗体とを結合させる方法は種々の方法が開発されている。

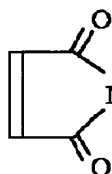
【0021】

【発明が解決しようとする課題】ところで、例えば、前記従来の特開平4-204379号公報に開示されているような、免疫化学的検出方法において、核酸に結合された免疫化学的活性物質(核酸-免疫化学的活性物質複合体と呼ぶ)に保持されている活性は、その測定あるいは検出系の検出感度を決定するという重要な意義を持

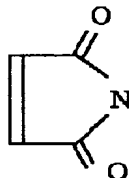
つ。また同時に、その核酸-免疫化学的活性物質複合体の調製方法において、得られる核酸-免疫化学的活性物質複合体の回収率は、こうした複合体を用いた免疫化学的分析試薬のコストに大きな影響を及ぼすものである。

【0022】一方、核酸と、酵素または抗体とを結合させる前記の種々の従来の方法は、得られる核酸と酵素または抗体とを結合させた複合体の回収率は60～80%程度またはそれ以下であり、何れの方法も回収率およびその活性が低いという問題があった。

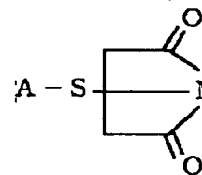
【0023】したがって、核酸と、免疫化学的活性物質（例えば、酵素または抗体等）とを結合させて核酸-免疫化学的活性物質複合体を提供し、この核酸-免疫化学的活性物質複合体を用いて免疫化学的分析を行なうためには、その複合体の回収率およびその複合体の活性を上げる必要がある。



〔式（1）中、 $n_1, n_2$  および  $n_3$  はそれぞれ独立した0から15のあいだの整数を、 $R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ化学結合または6員環状炭化水素残基を表す。〕を反応さ



〔式（2）中、Bは核酸をB-NH<sub>2</sub>で表したときのその残基を表し、 $n_1, n_2$  および  $n_3$  はそれぞれ独立した0から15のあいだの整数を、 $R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ化学結合または6員環状炭化水素残基を表す。〕化合物を得、ついでこの式（2）の化合物を免疫化学的活性物質



〔式（3）中、Aは免疫化学的活性物質をA-SHで表したときのその残基を表し、B、 $n_1, n_2, n_3$ 、 $R_1$  および  $R_2$  はそれぞれ化学結合または6員環状炭化水素残基を表す。〕を得ることを特徴とする核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法とするものである。

【0029】また本発明は、上記の核酸と免疫化学的活性物質との複合体の製造方法により得られ、上記式

（3）で表される免疫化学的分析法に使用される核酸と免疫化学的活性物質との複合体とするものである。

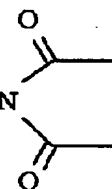
【0024】そこで本発明は、従来の核酸と、酵素または抗体等のタンパク質との結合法よりも高回収率を実現した核酸-免疫化学的活性物質複合体とし、その核酸-免疫化学的活性物質複合体の活性をより高く保持することを実現し、生体成分分析法、特に抗原抗体反応を利用した免疫化学的分析法に使用できる核酸-免疫化学的活性物質複合体自体の提供、その製造方法の提供、およびその核酸-免疫化学的活性物質複合体を使用した免疫化学的測定試薬を提供することを目的とする。

【0025】

【課題を解決するための手段】前記した問題点を解決するために、本発明は、核酸に次の式（1）で表される化合物、

【0026】

〔化6〕



式（1）

せることにより、次の式（2）で示される化合物、

【0027】

〔化7〕

と反応させることにより、次の式（3）で表される化合物、

【0028】

〔化8〕

【0030】また本発明は、このようにして得られた上記式（3）で表される核酸と免疫化学的活性物質との複合体を含んだ免疫化学的測定試薬とするものである。

【0031】本発明において、前記核酸に含有されるアミノ基（NH<sub>2</sub>-）が、核酸の3'末端または5'末端のもの、あるいは核酸の分子中に導入されたものであってもよい。

【0032】本発明において免疫化学的活性物質とは、免疫化学的測定法に使用されて、免疫化学的な反応を生

ずる物質であり、A-SHで表すことができ、その免疫化学的活性物質は、分子中にスルフヒドリル基を有している。そのスルフヒドリル基は、免疫化学的活性物質に本来含まれているものでもよいし、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物（以下、無水コハク酸と略記する）などを用いて免疫化学的活性物質にスルフヒドリル基を導入したものでもよい。また、分子中にジスルフィド基を有する場合は2-メルカプトエチルアミンなどの還元剤を用いてスルフヒドリル基を生成させたものでもよい。

【0033】本発明において使用される免疫化学的活性物質には、抗原、ハプテン、抗体が挙げられる。具体的には、例えば、免疫グロブリン、その酵素分解物（例えば、F(a b')<sub>2</sub>、F a b'、F a b等）、アルブミン、フィブリノーゲン（フィブリンおよびそれらの分解産物）、 $\alpha$ -フェトプロテイン、ガン胎児性抗原、C反応性タンパク質、ミオグロブリン、肝炎ウイルス抗原、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ヒト胎盤性ラクトゲン、インスリン、HIVウイルス抗原、アレルゲン、細菌毒素、細菌抗原、酵素、ホルモン、薬剤などが挙げられる。

【0034】本発明における免疫化学的活性物質として、特に、F a b' は核酸との複合体、即ち、核酸-免疫化学的活性物質複合体が高収率で得られる点、および得られた核酸-免疫化学的活性物質複合体の活性が高い点において好ましい。

【0035】本発明において核酸としては、リボ核酸やデオキシリボ核酸を構成要素とする種々の組み合わせの、種々の長さのものを使用することができる。例えば、ポリリボヌクレオチド、ポリデオキシリボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチド、これら2種以上の複合体、あるいは互いの相補的な配列により結合した2本鎖以上のポリヌクレオチドあるいはオリゴヌクレオチドからなる錯体などが挙げられるが、10から200mer程度のオリゴヌクレオチドあるいはポリヌクレオチドが望ましい。なお、これらの核酸に放射性あるいは非放射性の標識を導入することもできる。

【0036】上記式(1)～式(3)中において、R<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>で表される6員環状炭化水素残基としては、飽和物、不飽和物のいずれでもよい。飽和6員環状炭化水素残基には、例えば、シクロヘキシレンが挙げられ、不飽和6員環状炭化水素残基には、例えば、フェニレンなどが挙げられる。該6員環状炭化水素残基には、例えば、シクロヘキシレンが好ましい。

【0037】上記式(1)で表される化合物には、例えば、N-( $\epsilon$ -マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド（別名：N-スクシンイミジル-6-マレイミドヘキサノエート）、N-( $\gamma$ -マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド（別名：N-スクシンイミジル-4

-マレイミドブチレート）、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート、スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、スクシンイミジル-4-(パラ-マレイミドフェニル)ブチレート、スルホスクシンイミジル-4-(パラ-マレイミドフェニル)ブチレート等が挙げられる。

【0038】本発明において、免疫化学的測定または免疫化学的分析とは、核酸-免疫化学的活性物質複合体における免疫化学的活性物質が、免疫反応によって被測定物質と直接または間接に結合することにより、その被測定物質の存在及び/又はその量を検出することをいう。

【0039】本発明の核酸-免疫化学的活性物質複合体を用いて免疫学的測定を行なう際の被測定物質としては、臨床診断に利用される物質が挙げられ、例えば体液、尿、喀痰、糞便中などに含まれるヒトイムノグロブリンG、ヒトイムノグロブリンM、ヒトイムノグロブリンA、ヒトイムノグロブリンE、ヒトアルブミン、ヒトフィブリノーゲン（フィブリンおよびそれらの分解産物）、 $\alpha$ -フェトプロテイン、C反応性タンパク質、ミオグロビン、ガン胎児性抗原、肝炎ウイルス抗原、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ヒト胎盤性ラクトゲン、インスリン、HIVウイルス抗原、アレルゲン、細菌毒素、細菌抗原、酵素、ホルモン、薬剤などが挙げられる。

【0040】つぎに、本発明の核酸-免疫化学的活性物質複合体において、免疫化学的活性物質(A-SH)のAが抗体残基であるものを免疫化学的分析における試薬として使用した場合のキットの構成例、キットの使用方法を説明する。

【0041】(I) Aが抗体残基である場合  
サンドイッチ法による酵素免疫測定法(EIA)を例にすれば、次のようなキットの構成例が示される。

#### 【0042】抗原検出用キットの構成例

抗原検出用EIA試薬キットは、例えば、下記の試薬①～試薬⑦から構成される。

【0043】試薬①：核酸が結合した固相（即ち、核酸-免疫化学的活性物質複合体中の核酸に相補的な配列を有する核酸を固相に結合させたものである。）。

【0044】試薬②：核酸-免疫化学的活性物質複合体（具体例には、核酸と抗体フラグメント、例えば、F a b' が核酸に結合されたものが挙げられる。）。

【0045】試薬③：被測定物質の標準品（具体例には、前記抗体フラグメント、例えば、F a b' に免疫化学的に結合するもの、例えば、抗原の標準品が挙げられる。）。

【0046】試薬④：酵素で標識された抗体フラグメント（具体例には、抗体フラグメント例えば、F a b' が

10

20

30

40

50

酵素で標識されたものが挙げられる。前記③の被測定物質に反応する抗体に、酵素を結合させたものであればいずれでもよく、その標識酵素の一例としては西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性フォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼなどが挙げられる。

【0047】試薬⑤：希釈用緩衝液（上記②および③の試薬の希釈用、並びに被測定試料の希釈用に使用可能な緩衝液である。その一例として、pH 6～9のTES緩衝液、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液などが挙げられる。）。

【0048】試薬⑥：洗浄液（インキュベーション後、固相の洗浄に用いることの可能な緩衝液あるいは溶液である。その一例として、TES緩衝液、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、食塩溶液などが挙げられる。）。

【0049】試薬⑦：酵素活性測定に必要な試薬（その一例として、試薬④において標識酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼであり、測定法が比色法の場合、酵素活性測定に必要な試薬には3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンと過酸化水素が用いられる。また、測定法が蛍光法の場合、p-ヒドロキシフェニル酢酸と過酸化水素が用いられる。また、測定法が発光法の場合、ルミノールと過酸化水素が用いられる。また、何れの測定法の場合にも酵素基質の溶解に用いる緩衝液および酵素反応停止液が使用される。）。

【0050】上記に例示した試薬①～試薬⑦からなるキットは、例えば、下記の方法で使用する事ができる。

#### 【0051】抗原検出用キットの使用法

試薬③である被測定物質の標準品もしくは被検液の5～1000 $\mu$ lに対して、試薬⑤を加えて希釈し、試薬②および試薬④を含む溶液の5～1000 $\mu$ lを加えて一定時間約0～60℃で反応させる。反応後、試薬①を一定量加えて、一定時間反応させる。この後、試薬⑥により固相を洗浄し、固相上に結合している酵素の活性を測定する。この酵素の活性の測定には、この酵素の基質を約10～1000 $\mu$ l加えて、約0～50℃で一定時間反応させて、反応液中の吸光度、蛍光強度あるいは発光の程度を測定することにより、酵素活性を測定する。

【0052】または上記とは別の使用方法として、あらかじめ一定量の試薬①と試薬②を反応させた後、固相を洗浄して抗体を固相に結合させておく。この固相と被測定物質の標準品もしくは被検液の5～1000 $\mu$ lに試薬⑤を加えて希釈したものを反応させ、反応後、固相を洗浄し、試薬④を添加して反応させる。この後、固相を洗浄して、固相に結合した酵素量を酵素検出用試薬⑦を添加して酵素反応を行ない、反応液中の吸光度、蛍光強度、発光の程度等を測定することもできる。

【0053】また、酵素の測定にあたっては、固相に結合している試薬②-試薬③-試薬④からなる免疫複合体を遊離させてその酵素量を測定することもできる。

【0054】つぎに、本発明の核酸-免疫化学的活性物質複合体において、免疫化学的活性物質（A-SH）のAが抗原残基であるものを免疫化学的分析法における試薬として使用した場合のキットの構成例、キットの使用方法を説明する。

【0055】（11）Aが抗原残基である場合

前記（1）の場合と同様に、サンドイッチ法による酵素免疫測定法（EIA）を例にすれば、次のようなキットの構成例が示される。

#### 【0056】抗体検出用キットの構成例

抗体検出用EIA試薬キットは、例えば、下記の試薬①～試薬⑦から構成される。

【0057】試薬①：核酸が結合した固相（即ち、核酸-免疫化学的活性物質複合体中の核酸に相補的な配列を有する核酸を固相に結合させたものである。）。

【0058】試薬②：核酸-免疫化学的活性物質複合体（具体例には、核酸と抗原を結合させたものが挙げられる。）。

【0059】試薬③：被測定物質の標準品（具体例には、前記抗原と免疫化学的に結合するものの標準品が挙げられる。）。

【0060】試薬④：酵素で標識された抗体フラグメント（具体例には、抗体フラグメント、例えば、Fab'が酵素で標識されたものが挙げられる。前記③の被測定物質に反応する抗体に、酵素を結合させたものであればいずれでもよく、その標識酵素の一例としては西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性フォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼなどが挙げられる。）。

【0061】試薬⑤：希釈用緩衝液（上記②および③の試薬の希釈用、並びに被測定試料の希釈用に使用可能な緩衝液である。その一例として、pH 6～9のTES緩衝液、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液などが挙げられる。）。

【0062】試薬⑥：洗浄液（インキュベーション後、固相の洗浄に用いることの可能な緩衝液あるいは溶液である。その一例として、TES緩衝液、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、食塩溶液などが挙げられる。）。

【0063】試薬⑦：酵素活性測定に必要な試薬（その一例として、試薬④において標識酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼであり、測定法が比色法の場合、酵素活性測定に必要な試薬には3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンと過酸化水素が用いられる。また、測定法が蛍光法の場合、p-ヒドロキシフェニル酢酸と過酸化水素が用いられる。また、測定法が発光法の場合、ルミノールと過酸化水素が用いられる。また、何れの測定法の場合にも酵素基質の溶解に用いる緩衝液および酵素反応停止液が使用される。）。

【0064】上記に例示した試薬①～試薬⑦からなるキットは、例えば、下記の方法で使用する事ができる。



## 【0065】抗体検出用キットの使用法

試薬③である被測定物質の標準品もしくは被検液の5～1000 $\mu$ lに対して、試薬⑤を加えて希釈し、試薬②および試薬④を含む溶液の5～1000 $\mu$ lを加えて一定時間約0～60℃で反応させる。反応後、試薬①を一定量加えて、一定時間反応させる。この後、試薬⑥により固相を洗浄し、固相上に結合している酵素の活性を測定する。この酵素の活性の測定には、この酵素の基質を約10～1000 $\mu$ l加えて、約0～50℃で一定時間反応させて、反応液中の吸光度、蛍光強度あるいは発光の程度を測定する。

【0066】または上記とは別の使用方法として、あらかじめ一定量の試薬①と試薬②を反応させた後、固相を洗浄して抗原を固相に結合させておく。この固相と被測定物質の標準品もしくは被検液の5～1000 $\mu$ lに試薬⑤を加えて希釈したものを反応させ、反応後、固相を洗浄し、試薬④を添加して反応させる。この後、固相を洗浄して、固相に結合した酵素量を酵素検出用試薬⑦を添加して酵素反応を行ない、反応液中の吸光度、蛍光強度、発光の程度等を測定することもできる。

【0067】また、酵素の測定にあたっては、固相に結合した試薬②-試薬③-試薬④からなる免疫複合体をさらに遊離させてその酵素量を測定することもできる。

【0068】本発明は、標識抗体に酵素標識抗体を用いた酵素免疫化学的分析法以外にも、放射性同位元素を標識抗体に用いたラジオイムノアッセイ、金コロイドなどで標識した抗体を用いる免疫分析法、アクリジウムエステルなどの発光性物質で標識された抗体を用いる免疫分析法、フルオロセインなどの蛍光物質で標識された抗体を用いる免疫化学的分析法などに利用することができる。

【0069】

【実施例】本発明を実施例により具体的に説明する。

【0070】〔実施例1〕

オリゴヌクレオチド-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体の製造およびその複合体の回収

5'末端にアミノ基を有する次に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをアプライド バイオシステム社製自動DNA合成装置391Aを用いて合成した。

【0071】アミノ基-TTT TTT TTT TT  
T TTT TTT TT

このヌクレオチドを169.16nmol含む0.1M TES [N-トリス(ヒドロキシメチル, 2アミノエタンスルホン酸) p H 7.0, 1.0mlに対して、100 $\mu$ lのN, N-ジメチルホルムアミドに溶解した前記式(1)で表され、式(1)において、 $r_1=0$ ,  $r_2=0$ ,  $r_3=5$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ が化学結合である場合の結合試薬、即ち、N-( $\epsilon$ -マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド5.25mgを加えて、37℃、60分間反応させることにより、マレイミ

ド基をオリゴヌクレオチドに結合させた。反応後セファデックスG-25によりオリゴヌクレオチドと結合試薬を分離し、オリゴヌクレオチドを分子量2000を限界排除とする限外濾過膜を用いて濃縮した。

【0072】一方、抗原としての西洋ワサビペルオキシダーゼ375nmolを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液p H 7.0に対して、366 $\mu$ lのN, N-ジメチルホルムアミドに溶解した6.53mmolの無水コハク酸を加えて、30℃、30分間反応させた。反応後0.1mlの1M トリス-塩酸緩衝液p H 7.0および0.1mlの1Mハイドロキシルアミンp H 7.0を加えて30℃、30分間反応させ脱保護を行なった。この後、過剰の無水コハク酸などをセファデックスG-25カラムクロマトグラフィーにより除き、西洋ワサビペルオキシダーゼに相当する画分を集めた。この集めた画分を限界排除分子量为10000である限外濾過膜を用いて濃縮し、4, 4'-ジチオオピリジンを用いてスルフヒドリル基の定量を行なうとスルフヒドリル基:ペルオキシダーゼ=3.98:1であることがわかった。

【0073】前記マレイミド基導入オリゴヌクレオチド26.1nmolと前記スルフヒドリル基導入西洋ワサビペルオキシダーゼ26.1nmolを混合し、37℃、1時間反応させ、西洋ワサビペルオキシダーゼに導入されたスルフヒドリル基とオリゴヌクレオチドに導入されたマレイミド基を結合させることによってオリゴヌクレオチドと西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させた。その後この混合物をウルトロゲルAcA44カラムにかけ、5mM EDTA(エチレンジアミンテトラアセチックアシッド)を含む0.1Mリン酸緩衝液p H 6.0により溶出させて、オリゴヌクレオチド-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体を回収した。前記カラムから溶出された各フラクションに対して、260nm、280nm、403nmにおけるそれぞれの吸光度を測定した。この結果を図4に示す。

【0074】図4中の白四角印□は、西洋ワサビペルオキシダーゼの特異的な吸収波長403nmにおける吸光度を示す。黒三角印▲はオリゴヌクレオチドの最大吸収波長260nmにおける吸光度を、白丸印○はタンパク質の最大吸収波長280nmにおける吸光度をそれぞれ示す。図4からは、本発明の方法において、西洋ワサビペルオキシダーゼとオリゴヌクレオチドが結合したものと、結合していないオリゴヌクレオチドが効率よく分離されていることが分かる。

【0075】フラクション31から45を収集し、そのオリゴヌクレオチド-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体の回収率はほぼ100%であった。なお、スルフヒドリル基の導入処理をしていない西洋ワサビペルオキシダーゼは、フラクション46をピークとして溶出されることが分かっている。この画分の一部と処理を施していない西洋ワサビペルオキシダーゼを、ドデシル硫酸ナトリ

ウムを含む10%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動分析法で分子量を比較してみたところ、前者は後者と同じの分子量のバンドを持たず分子量として5000から6000程度高分子のところにメジャーなバンドが移動していることが確認された。

#### 【0076】〔実施例2〕

##### オリゴヌクレオチド-抗CTF a b' 複合体の製造およびその複合体の回収

抗原としてコレラ菌が産生するコレラ毒素(略号:CT)を家兎に免疫して、CTに対する抗血清を調製した。この抗血清1mlに対して0.18gの硫酸ナトリウムを加えて30分間攪拌して塩析を行ない、その後、遠心分離により沈殿物を回収した。得られた沈殿物を少量の17.5mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.3で溶解した後、同緩衝液に対して透析した。透析した溶液をDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーによりIgG画分を分取した。IgG画分をペプシンで処理した後、ウルトロゲルAcA44カラムを用いたクロマトグラフィーを行ない、抗CTF(a b')<sub>2</sub>を2-メルカプトエチルアミンで還元し、セファデックスG-25カラムクロマトグラフィーにより抗CTF a b'を調製した。

【0077】一方、5'末端にアミノ基を有する次に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドをアプライドバイオシステム社製自動DNA合成装置391Aを用いて合成し、固相導入用オリゴヌクレオチドとした。

【0078】アミノ基- $\text{CG ACG GAT CCC CGG GAA TTC}$

このオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有し、且つそのオリゴヌクレオチドの5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドを上記と同様に合成し、このヌクレオチドを253.74nmol含む0.1M TES、pH7.0、0.5mlに対して、50μlのN,N-ジメチルホルムアミドに溶解した、前記式(1)で表され、その式(1)中において、 $r_1=0$ 、 $r_2=0$ 、 $r_3=5$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ が化学結合である場合の結合試薬、即ち、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド7.8mgを加えて37℃、60分間反応させることにより、マレイミド基をオリゴヌクレオチドに導入した。反応後セファデックスG-25によりオリゴヌクレオチドと結合試薬を分離し、オリゴヌクレオチドを分子量2000を限界排除とする限外濾過膜を用いて濃縮した。濃縮したオリゴヌクレオチドは205.6nmolであった。またY. Okuraの方法(Microbiol. Immunol., 32, 807-816, 1988)にしたがってマレイミド基の定量を行なうと、オリゴヌクレオチド:マレイミド基=1:1.42であった。

【0079】前記抗CTF a b' 101nmolに対して前記マレイミド基導入オリゴヌクレオチド144.3nmolを混合し、37℃、1時間反応させることによ

り、前記抗CTF a b'のヒンジ部SH基とマレイミド基導入オリゴヌクレオチドを結合させた。その後この混合物をウルトロゲルAcA44カラムにかけ0.1Mリン酸緩衝液pH6.0により溶出させた。溶出物に、オリゴヌクレオチドと抗CTF a b'が結合しているオリゴヌクレオチド-抗CTF a b'複合体が存在することは260nmおよび280nmにおける吸光度を測定することによって確認した。

【0080】図5に各フラクションに対する吸光度の測定結果をグラフとして示した。図5中における白三角印△は260nmにおける吸光度を、白丸印○は280nmにおける吸光度をそれぞれ示す。フラクション40前後で溶出されてくるものがオリゴヌクレオチド-抗CTF a b'複合体であり、フラクション55前後に溶出されているのが抗CTF a b'に結合しなかったオリゴヌクレオチドである。

【0081】図5からわかるように本実施例2の製造方法を用いると、効率よくオリゴヌクレオチド-抗CTF a b'複合体が得られることが分かる。フラクション33から45までを収集し吸光度の比からオリゴヌクレオチドの導入率を調べたところ、1モルの抗CTF a b'に対して1モルのオリゴヌクレオチドが導入されていることが分かった。また反応に使用した抗CTF a b'のほぼ100%がオリゴヌクレオチド-抗CTF a b'複合体として回収された。

#### 【0082】〔実施例3〕

##### オリゴヌクレオチド導入固相とオリゴヌクレオチド-抗CTF a b'複合体によるコレラ毒素の検出

前記実施例2で製造した固相導入用オリゴヌクレオチドを、アミノ基が導入されたポリスチレンビーズにグルタルアルデヒドで共有結合させることにより、オリゴヌクレオチド導入固相を製造した。このオリゴヌクレオチド導入固相を0.1%アジ化ナトリウム、0.1%スキムミルクおよび5mM EDTAを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液、0.1M塩化ナトリウムpH7.0中に保存した。

【0083】このオリゴヌクレオチド導入固相と、前記実施例2で製造したオリゴヌクレオチド-抗CTF a b'複合体を用いて、コレラ毒素がどの程度の量まで検出できるかを調べた。すなわち、各30.5pg/ml、122pg/ml、488pg/ml、1.95ng/ml、7.8ng/ml、31.2ng/mlの濃度のコレラ毒素溶液250μlに、オリゴヌクレオチド-抗CTF a b'複合体と西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗CTF a b'をそれぞれ20pmol/mlおよび800ng/ml含む緩衝液250μl中で、37℃、1時間反応させ、前記オリゴヌクレオチド導入固相を投入し、37℃、1時間反応させた。その後、0.3M塩化ナトリウム溶液で洗浄した後、テトラメチルベンジジンを用いて酵素活性を測定し検量線を作製した。こ

のコレラ毒素濃度に対する450nmにおける吸光度の測定結果を図6に示した。なお、図6中のプロット点は実際のコレラ毒素濃度、すなわち上記濃度の2倍希釈濃度を示している。その結果61pg/ml以上のコレラ毒素の検出が可能であることがわかった。

#### 【0084】〔実施例4〕

##### オリゴヌクレオチド導入固相とオリゴヌクレオチド-抗CTFa b' 複合体によるコレラ毒素の検出

前記実施例3に記載したオリゴヌクレオチド導入固相と、前記実施例2に記載したオリゴヌクレオチド結合Fa b' を用いて、コレラ毒素がどの程度の量まで検出できるかを調べた。本実施例4においては前記実施例3と異なり、オリゴヌクレオチド導入抗体とオリゴヌクレオチド導入固相をあらかじめ反応させた後洗浄し、固相に抗体を結合させたものを使用した。

【0085】すなわち、前記実施例2に記載したオリゴヌクレオチド結合Fa b' と前記実施例3に記載したオリゴヌクレオチド導入固相とを予め核酸の相補的結合により結合させたものに対して、15pg/ml、61pg/ml、244pg/ml、976pg/ml、3.9ng/ml、15.6ng/mlの濃度のコレラ毒素溶液500μlを37℃、1時間反応させて、固相上にコレラ毒素を結合させた。

【0086】得られた固相を0.3M塩化ナトリウム溶液で洗浄した後、400ng/mlの西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗コレラ毒素Fa b' を37℃で1時間反応させた。その後、固相を再度0.3M塩化ナトリウム溶液で洗浄した後、テトラメチルベンジジンを用いて固相に結合した酵素量を調べ、検量線を作製した。このコレラ毒素濃度に対する450nmにおける吸光度の測定結果を図7に示す。コレラ毒素は15pg/ml以上が検出可能であることがわかった。

#### 【0087】〔実施例5〕

##### オリゴヌクレオチド導入固相とオリゴヌクレオチド-抗TDHF a b' 複合体によるTDHの検出

抗原として腸炎ピブリオの産生する耐熱性溶血素(TDH; Thermolysin)を家兎に免疫して抗血清を調製し、この抗血清から前記実施例2と同様の手法によりFa b' を調製した。

【0088】また5'末端にアミノ基を導入したアミノ基-GCC AAG CTT GGC TGC AGG TCに、マレイミド基を導入したマレイミド基導入オリゴヌクレオチドを前記実施例2と同様の方法で調製した。前記Fa b' とこのマレイミド基導入オリゴヌクレオチドを反応させてオリゴヌクレオチド-抗TDHF a b' 複合体を調製した。

【0089】一方、前記オリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドを合成し前記実施例3と同様にして固相に結合させた。こうして調製したオリゴヌクレオチド導入固相とオリゴヌクレオチド-抗TDHF a b' 複

合体を用いて、前記実施例3と同様にTDHがどの程度の量まで検出できるかを調べた。

【0090】すなわち、30.5pg/ml、122pg/ml、488pg/ml、1.95ng/ml、7.8ng/ml、31.2ng/mlの濃度のコレラ毒素溶液250μlに、オリゴヌクレオチド結合Fa b' と西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗TDHF a b' をそれぞれ20pmol/mlおよび800ng/ml含む緩衝液250μlと37℃、1時間反応させ、前記オリゴヌクレオチド固相を投入し、37℃1時間反応させた。その後、0.3M塩化ナトリウム溶液で洗浄した後、テトラメチルベンジジンを用いて酵素活性を測定し検量線を作製した。この耐熱性溶血毒素濃度に対する450nmにおける吸光度の測定結果を図8に示す。なお、図8中のプロット点は実際の耐熱性溶血毒素濃度、すなわち、上記濃度の2倍希釈濃度を示している。その結果244pg/ml以上のTDHの検出が可能であることがわかった。

#### 【0091】〔実施例6〕

##### オリゴヌクレオチド導入固相とオリゴヌクレオチド-抗TDHF a b' 複合体によるTDHの検出

前記実施例5に記載したオリゴヌクレオチド導入固相とオリゴヌクレオチド結合Fa b' を用いて、TDHがどの程度の量まで検出できるかを調べた。本実施例6においては、前記実施例5と異なり、ヌクレオチド導入抗体とヌクレオチド導入固相を予め反応させた後、洗浄し、固相に抗体を結合させたものを使用した。

【0092】すなわち、前記実施例5に記載したオリゴヌクレオチド-抗TDHF a b' 複合体と前記実施例5に記載したオリゴヌクレオチド導入固相とを、予め核酸の相補的結合により結合させておいた。得られた抗TDHF a b' が結合された固相に対して、各15pg/ml、61pg/ml、244pg/ml、976pg/ml、3.9ng/ml、15.6ng/mlの濃度のTDH溶液500μlを37℃、1時間反応させて固相上にTDHを結合させた。得られた固相を0.3M塩化ナトリウム溶液で洗浄した後、400ng/mlの西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗TDHF a b' を37℃で1時間反応させた。その後、固相を再度0.3M塩化ナトリウム溶液で洗浄した後、テトラメチルベンジジンを用いて固相に結合した酵素量を調べ、検量線を作製した。この耐熱性溶血毒素濃度に対する450nmにおける吸光度の測定結果を図9に示す。TDHは15pg/ml以上が検出可能であることがわかった。

#### 【0093】〔比較例1〕

ゴシュラの方法によるオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素F(a b') 複合体の製造およびその複合体の回収  
オリゴヌクレオチド-免疫化学的活性物質複合体の調製を、Bioconjugate Chemistry, (1:71-76, 1990, S.S.Ghosh, P.M.Kao, A.W.McCue, and H.L.Chappele)に記載され

10

20

30

40

50

ている方法により行なった。

【0094】フルオレセイン標識ウサギF (a b') , 0.1mgを添加したウサギの抗コレラ毒素F (a b') : 4.09mgを0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7.0に溶解した。これに50モル過剰のN-(ε-マレイミドカプロイルオキシ) スクシンイミド (以下EMCSと略記する) を添加して、30℃、30分間インキュベートした後、セファデックスG-25樹脂を用いたゲルカラムクロマトグラフィーを行なうことにより、マレイミド基を導入した抗コレラ毒素F (a b') : と、未反応のEMCSを分離した。マレイミド基導入抗コレラ毒素F (a b') : をアミコンYM-30限外濾過膜を用いて濃縮した。

【0095】一方、アプライドバイオシテムス社製DNA合成装置391Aを用いて5'末端にアミノ基を有する次に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0096】アミノ基-GAA TTC CCG GG  
G ATC CGT CG

このオリゴヌクレオチドに50モル過剰のN-スクシンイミジル-S-アセチルチオエート (以下SATAと略記する) を添加して30℃30分間インキュベートした。インキュベート後、それぞれ終濃度0.1Mとなるように1Mトリス-塩酸緩衝液pH7.0と1MヒドロキシルアミンpH7.0を添加し、30℃10分間インキュベートした。この後、オリゴヌクレオチドを常法にしたがってエタノール沈殿により分画した。

【0097】沈殿として得られたオリゴヌクレオチドを0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH6.0で溶解し、限外濾過により濃縮したマレイミド基導入抗コレラ毒素F (a b') : と混合して、30℃、1時間反応させた。反応後、ウルトロゲルAcA34樹脂を用いたゲルカラムクロマトグラフィーを行ない、オリゴヌクレオチドが結合した抗コレラ毒素F (a b') : と未反応オリゴヌクレオチドを分離し、オリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素F (a b') : 複合体に相当する分画、フラクション番号33から45までを収集した。図10に、各フラクションに対する280nmにおける吸光度と蛍光強度を測定して得たグラフを示す。図10中黒丸印●は280nmにおける吸光度を示し、黒三角印▲は蛍光強度を示す。

【0098】さらに、このフラクション番号33から45まで収集した画分を東ソー社製G3000SW樹脂を用いたゲルカラムクロマトグラフィーにより純度を調べた。図11に、そのゲルクロマトグラフィーによる流出経過時間に対する各成分の流出量 (%) のパターンを示す。その結果、オリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素F (a b') : 複合体に相当する画分は全体の280nmにおける吸光度の57.6%であることがわかった。

【0099】【実施例7】

本発明によるオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素F (a b') : 複合体の製造およびその複合体の回収

前記比較例1と対比するために、本発明のオリゴヌクレオチド-免疫化学的活性物質複合体の調製を次のように行なった。

【0100】フルオレセイン標識ウサギF (a b') , 0.1mgを添加したウサギの抗コレラ毒素F (a b') : 4.09mgを0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH7.0に溶解した。これに50モル過剰のSATAを添加して、30℃、30分間インキュベートした後、それぞれ終濃度0.1Mとなるように1Mトリス-塩酸緩衝液pH7.0と1MヒドロキシルアミンpH7.0を添加し、30℃、10分間インキュベートした。セファデックスG-25樹脂を用いたゲルカラムクロマトグラフィーを行なうことにより、スルフヒドリル基が導入された抗コレラ毒素F (a b') : と未反応のSATAを分離した。得られたスルフヒドリル基導入抗コレラ毒素F (a b') : をアミコンYM-30限外濾過膜を用いて濃縮した。

【0101】一方、アプライドバイオシテムス社製DNA合成装置391Aを用いて5'末端にアミノ基を有する次に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0102】アミノ基-GAA TTC CCG GG  
G ATC CGT CG

このオリゴヌクレオチドに50モル過剰のEMCSを添加して30℃30分間インキュベートした。インキュベート後、オリゴヌクレオチドを常法にしたがってエタノール沈殿により分画した。沈殿として得られたオリゴヌクレオチドを0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液pH6.0で溶解し、限外濾過により濃縮したスルフヒドリル基導入ウサギ抗コレラ毒素F (a b') : と混合して、30℃、1時間反応させた。

【0103】反応後、ウルトロゲルAcA34樹脂を用いたゲルカラムクロマトグラフィーを行ない、オリゴヌクレオチドが結合した抗コレラ毒素F (a b') : と未反応オリゴヌクレオチドを分離し、オリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素F (a b') : 複合体に相当する分画、フラクション番号32から47までを収集した。図12に各フラクションに対する、280nmにおける吸光度と蛍光強度を測定して得たグラフを示す。図12中、黒丸印●は280nmにおける吸光度を示し、黒三角印▲は蛍光強度を示す。

【0104】さらに、このフラクション番号32から47まで収集した分画を東ソー社製G3000SW樹脂を用いたゲルカラムクロマトグラフィーにより純度を調べた。図13にそのゲルクロマトグラフィーによる流出経過時間に対する各成分の流出量 (%) のパターンを示す。その結果、オリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素F (a b') : 複合体に相当する画分は全体の280nm

における吸光度の 75.4%であった。

【0105】この結果を前記比較例 1 のゴシュラの方法と比較すると、ゴシュラの方法により調製して得たオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体の画分%に比較して、本実施例 7 の画分%は 17.8%高く、本発明による方法の方が核酸-免疫化学的活性物質複合体の純度において優れていることがわかる。

【0106】〔比較例 2〕

オリゴヌクレオチド導入固相とオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体によるコレラ毒素の検出

前記比較例 1 および前記実施例 7 において調製した、各オリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体を用いて、コレラ毒素に対する反応性を次の方法により調べた。

【0107】すなわち、オリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体と、該複合体中のヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを結合させた固相とをあらかじめそれぞれ一定濃度で一定時間反応させ、双方のオリゴヌクレオチドの相補的な結合により固相にオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : を固定した。その後、0.3M 塩化ナトリウムを含む 0.01M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0 (以下洗浄用緩衝液と略す) で、固相結合抗コレラ毒素 F (a b') : を洗浄した。

【0108】一方、種々の濃度のコレラ毒素を含む溶液を、0.002% チメロサル、0.1% 牛血清アルブミン、1mM EDTA、0.3M 塩化ナトリウムを含む 10mM ビシナー水酸化ナトリウム緩衝液 pH 8.3 (以下、希釈緩衝液と略す) を用いて調製した。

【0109】前記の種々のコレラ毒素を含む各溶液のそれぞれに、前記のオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体が結合した固相を投入して、37℃、1時間反応させた。洗浄用緩衝液で固相を洗浄後、Y. Oku らの方法 (Microbiol. Immunol., 32, 807-816, 1988) により調製したペルオキシダーゼ標識抗コレラ毒素 F a b' を 400ng/ml の濃度で含む希釈緩衝液と 37℃ 1時間反応させた。固相を再び洗浄後、前記 Y. Oku らの方法にしたがって固相に結合したペルオキシダーゼを調べた。

【0110】図 14 は種々のコレラ毒素濃度に対する 450nm における吸光度の測定値をグラフにしたものである。図 14 中、黒丸印●は、本発明の前記実施例 7 により得られたオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体を示し、白三角印▲はゴシュラの方法に基づいて作製した前記比較例 1 のオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体を示す。

【0111】その結果、前記比較例 1 のゴシュラの方法により調製したオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体よりも前記実施例 7 の本発明による

オリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体を用いたほうが高い反応性を示すことが分かった。

【0112】〔比較例 3〕

本発明によるオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F a b' 複合体、およびゴシュラの方法によるオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体の反応性の比較

前記実施例 2 の本発明による方法で調製したオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F a b' 複合体と、前記比較例 1 のゴシュラの方法により調製したオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体のコレラ毒素に対する反応性を次のようにして調べた。

【0113】すなわち、各々、一定濃度の前記実施例 2 のオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F a b' 複合体および前記比較例 1 のオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体に対して、一定濃度のペルオキシダーゼ標識抗コレラ毒素 F a b' [Y. Oku らの方法 (Microbiol. Immunol., 32, 807-816, 1988) にしたがって調製した] を含む希釈緩衝液と、一定量のコレラ毒素を含む希釈緩衝液を混合し、37℃、1時間反応させた。反応後、得られた反応溶液を前記オリゴヌクレオチドに相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを結合させた固相と 37℃、1時間反応させた。反応後、洗浄用緩衝液で固相を洗浄し、Y. Oku らの方法 (Microbiol. Immunol., 32, 807-816, 1988) にしたがって固相に結合したペルオキシダーゼを調べた。

【0114】図 15 は種々のコレラ毒素濃度に対する 450nm における吸光度の測定値をグラフにしたものである。図 15 中、黒丸印●は、本発明の前記実施例 2 により得られたオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F a b' 複合体を示し、白三角印▲はゴシュラの方法に基づいて作製した前記比較例 1 のオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F (a b') : 複合体を示す。

【0115】その結果、本発明の前記実施例 2 により調製したオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F a b' 複合体を用いた方が、前記比較例 1 のゴシュラの方法により作製した複合体よりも反応性が高いことがわかった。なお、ゴシュラの方法では F a b' のヒンジ部スルフヒドリル基に特異的にオリゴヌクレオチドを導入することは不可能である。

【0116】

【発明の効果】本発明によれば、本発明は、核酸の 3' あるいは 5' 末端にマレイミド基を導入しておき、免疫化学的活性物質の側にスルフヒドリル基を導入し、この両者を混合して反応させることによって、免疫化学的測定法に有用な核酸-免疫化学的活性物質複合体を作製するので、本発明の核酸-免疫化学的活性物質複合体の回収率は 95~100% と高い。

【図面の簡単な説明】

【図 1】特開平 4-204379 号公報に開示の免疫化

10

20

30

40

50

学的検出法のプロセスを示す。

【図 2】ゴシュラの核酸とその末端に結合される抗体との結合方法のフローを示す。

【図 3】ゴシュラの核酸とその末端に結合される抗体との結合方法の別のフローを示す。

【図 4】実施例 1 におけるオリゴヌクレオチド-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体の各溶出フラクションの吸光度を示す。

【図 5】実施例 2 におけるオリゴヌクレオチド-抗 C T F a b' 複合体の各溶出フラクションの吸光度を示す。

【図 6】実施例 3 におけるオリゴヌクレオチド導入固相とオリゴヌクレオチド-抗 C T F a b' 複合体によるコレラ毒素の検出曲線を示す。

【図 7】実施例 4 におけるオリゴヌクレオチド導入固相とオリゴヌクレオチド-抗 C T F a b' 複合体によるコレラ毒素の検出曲線を示す。

【図 8】実施例 5 におけるオリゴヌクレオチド導入固相とオリゴヌクレオチド-抗 T D H F a b' 複合体による T D H (耐熱性溶血毒素) の検出曲線を示す。

【図 9】実施例 6 におけるオリゴヌクレオチド導入固相とオリゴヌクレオチド-抗 T D H F a b' 複合体による T D H (耐熱性溶血毒素) の検出曲線を示す。

【図 10】比較例 1 のゴシュラの方法により得られたオ

リゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F ( a b' ) : 複合体の各溶出フラクションの吸光度および蛍光強度を示す。

【図 11】図 10 の溶出フラクション番号 33 から 45 まで収集した画分のゲルクロマトグラフィーにおける流出経過時間に対する各成分の流出量 ( % ) のパターンを示す。

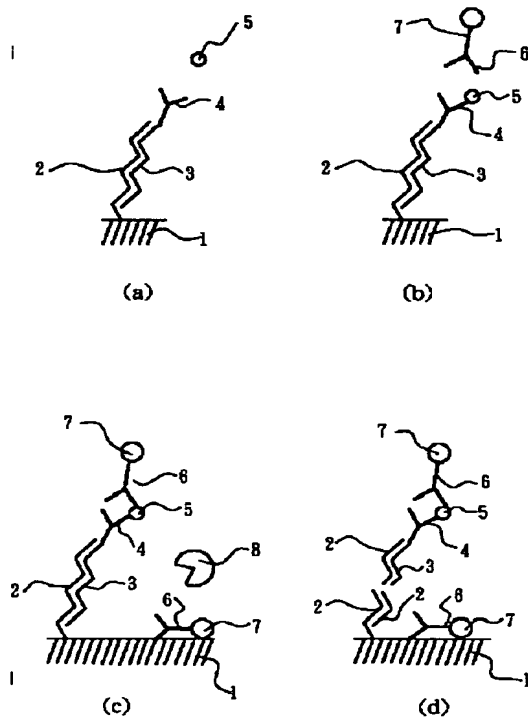
【図 12】実施例 7 におけるオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F ( a b' ) : 複合体の各溶出フラクションの吸光度および蛍光強度を示す。

【図 13】図 12 の溶出フラクション番号 32 から 47 まで収集した画分のゲルクロマトグラフィーによる流出経過時間に対する各成分の流出量 ( % ) のパターンを示す。

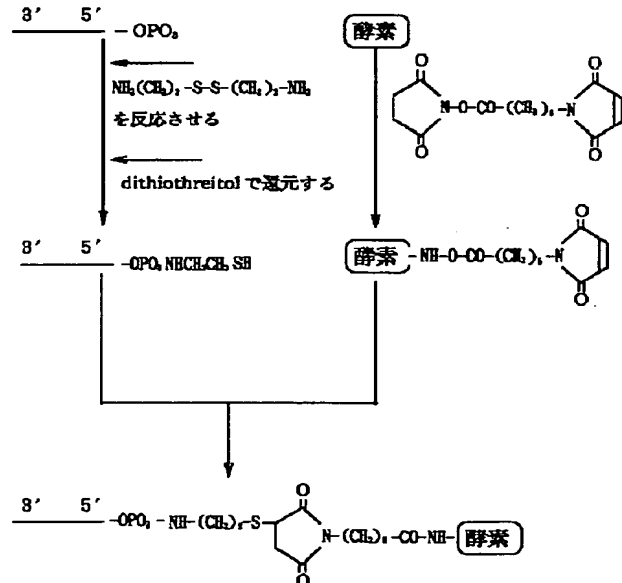
【図 14】比較例 1 および実施例 7 の各オリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F ( a b' ) : 複合体の種々のコレラ毒素濃度に対する 450 nm における吸光度の測定値を示す。

【図 15】比較例 1 のオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F ( a b' ) : 複合体および実施例 2 のオリゴヌクレオチド-抗コレラ毒素 F a b' 複合体の、種々のコレラ毒素濃度に対する 450 nm における吸光度の測定値を示す。

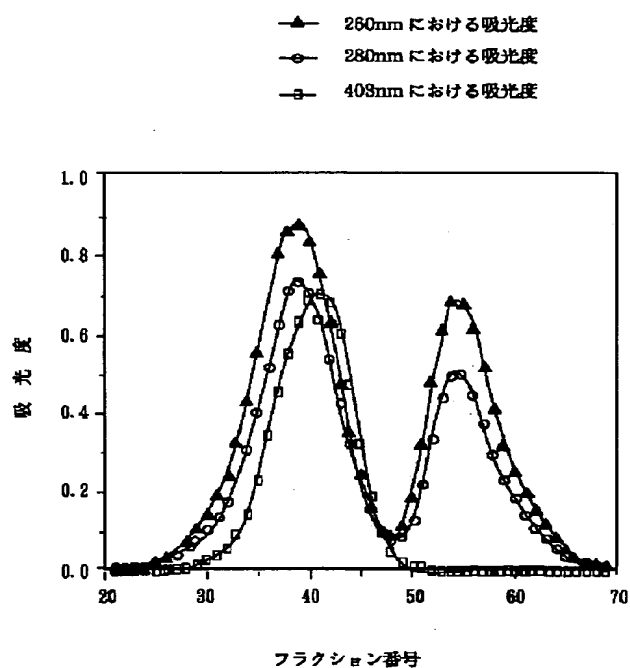
【図 1】



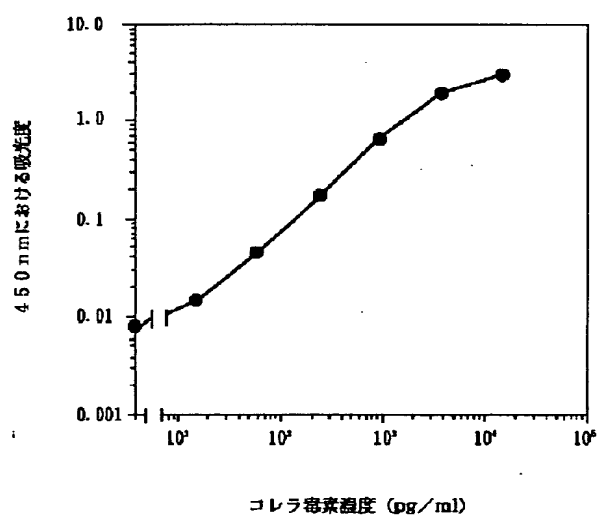
【図 2】



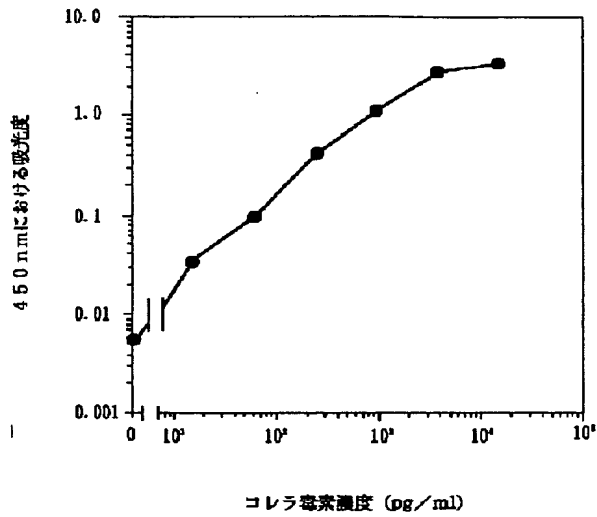
【圖 4】



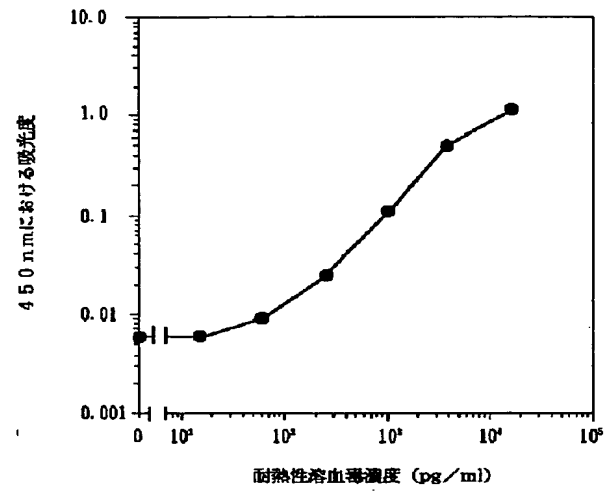
【図 6】



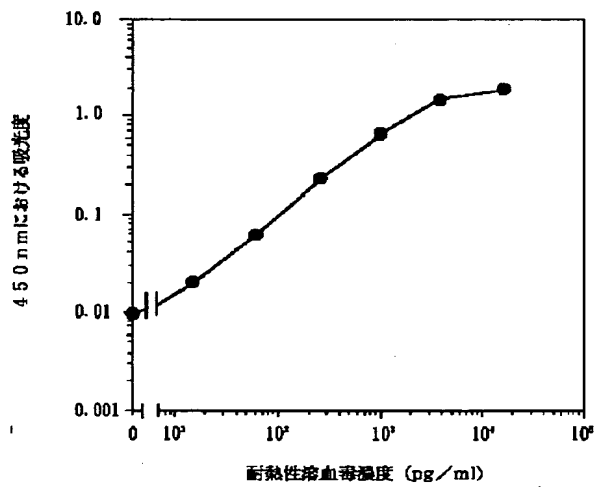
【 図 7 】



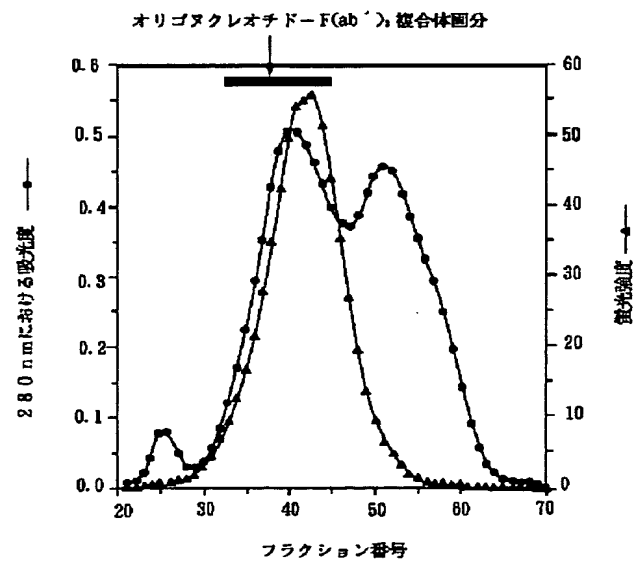
【 図 8 】



【 図 9 】

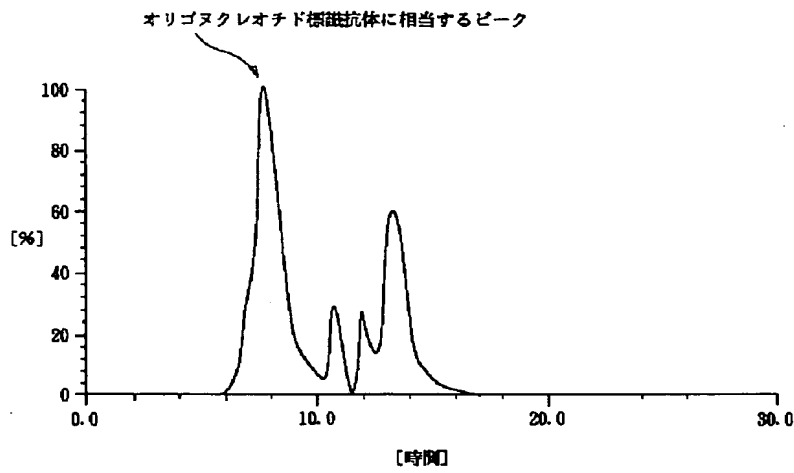


【 図 10 】

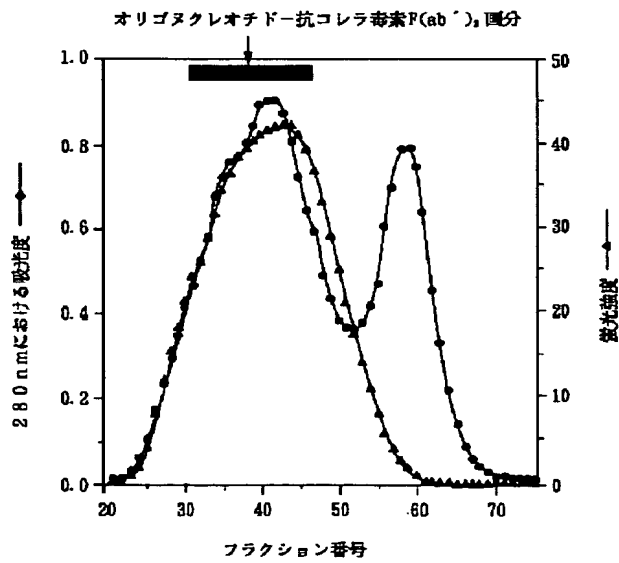




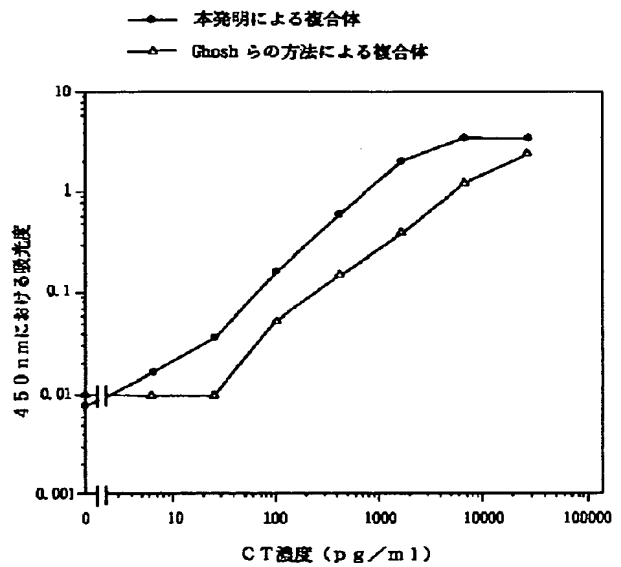
【 図 1 1 】



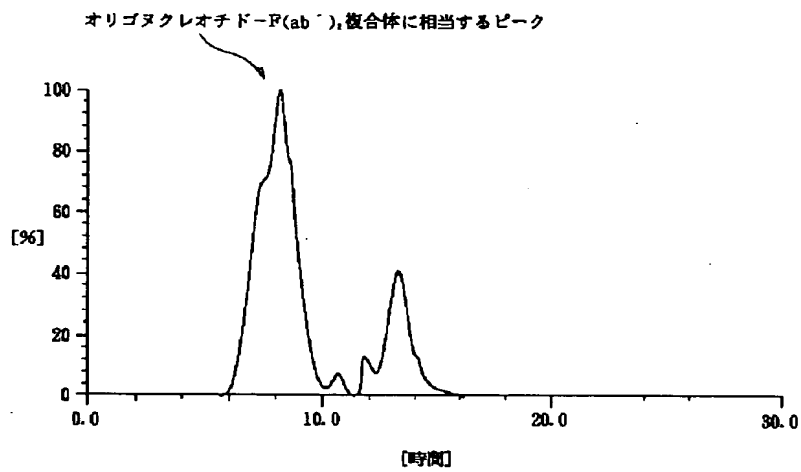
【 図 1 2 】



【 図 1 4 】



【図 1 3】



【図 1 5】

